

BEST AVAILABLE COPY

10/506548

10/506548

日本国特許庁

28.03.03

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 8月26日

出願番号

Application Number:

特願2002-245994

[ ST.10/C ]:

[ JP 2002-245994 ]

出願人

Applicant(s):

独立行政法人産業技術総合研究所  
生化学工業株式会社

REC'D 23 MAR

WIPO

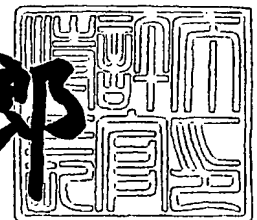
FCI

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 9日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3033934

【書類名】 特許願

【整理番号】 J200202600

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C08B 37/10  
C12N 9/10

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

【氏名】 成松 久

【発明者】

【住所又は居所】 東京都国立市中 1 - 1 0 - 2 3 ファミール国立 2 0 1

【氏名】 望月 秀雄

【特許出願人】

【識別番号】 301021533

【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【特許出願人】

【識別番号】 000195524

【氏名又は名称】 生化学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100120606

【弁理士】

【氏名又は名称】 五丁 龍志

【電話番号】 03-3270-0465

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 062307

【納付金額】 21,000円

【その他】 国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成 1 3 年度新エネルギー・産業技術総合開発機構、糖鎖合成関連遺伝子ライブラリーの構築委託研究、産業活力再生特別措置

法第 3 0 条の適用を受けるもの)

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0118594

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 四硫酸化構造を有するヘパリン／ヘパラン硫酸の誘導体の合成のための酵素剤

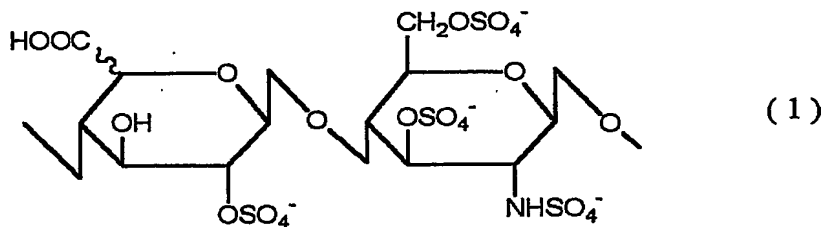
【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記（a）又は（b）記載のポリペプチドを含むことを特徴とする、下記式1記載の構造を含むグリコサミノグリカンの合成のための酵素剤。

（a）配列番号2記載のアミノ酸配列中のアミノ酸番号37乃至346からなるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

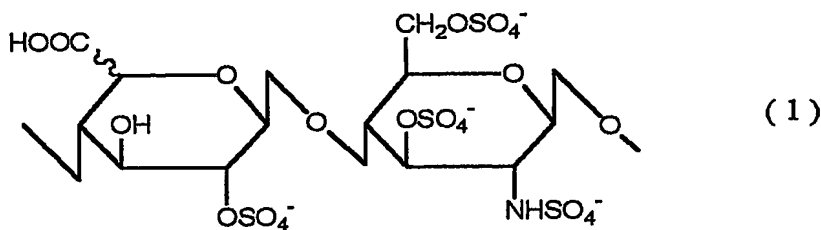
（b）配列番号2記載のアミノ酸配列中のアミノ酸番号37乃至346からなるアミノ酸配列に、1又は複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入若しくは転移を有するアミノ酸配列を含むと共に、硫酸基受容体であるヘパリン又はヘパラン硫酸に対して、硫酸基供与体から硫酸基を転移して、下記式1記載の構造を含むグリコサミノグリカン生成する活性を有するポリペプチド。

【化1】



【請求項2】 ヘパリン又はヘパラン硫酸に、請求項1記載の酵素剤を作用させて、硫酸基供与体から硫酸基を転移することを特徴とする下記式1記載の構造を含むグリコサミノグリカンの製造方法。

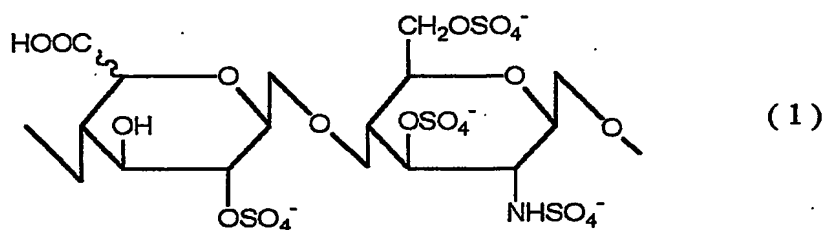
【化2】



【請求項3】 「配列番号2記載のアミノ酸配列中のアミノ酸番号37乃至

346からなるアミノ酸配列を含むポリペプチド」、又は「配列番号2記載のアミノ酸配列中のアミノ酸番号37乃至346からなるアミノ酸配列に、1又は複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入若しくは転移を有するアミノ酸配列を含むと共に、硫酸基受容体であるヘパリン又はヘパラン硫酸に対して硫酸基供与体から硫酸基を転移して、下記式1記載の構造を含むグリコサミノグリカンを生産する活性を有するポリペプチド」の、下記式1記載の構造を含むグリコサミノグリカンの合成のための使用。

【化3】



【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、構成二糖として「四つの硫酸基が結合した二糖」を含むグリコサミノグリカンの製造方法及びそのグリコサミノグリカンを合成するための酵素剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

本明細書中、糖及び糖残基は特に明記しない限り、光学異性体はイズロン酸を除き全てD体を示す。またD-グルコサミン（N置換体を含む意味で使用する）もある）を「GlcN」と、D-グルクロン酸を「GlcA」と、L-イズロン酸を「IdoA」と、ヘキサロン酸を「HexA」と略記することもある。

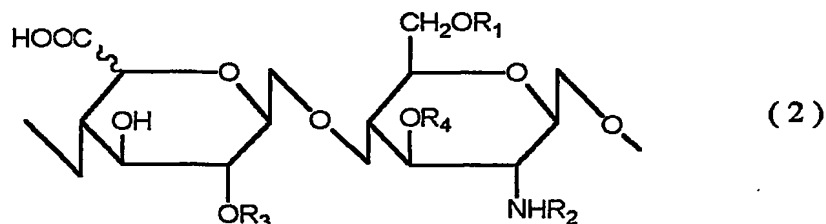
【0003】

ヘパリン及びヘパラン硫酸は、HexA（GlcA又はIdoA）とGlcNとが1,4グリコシド結合してなる「二糖単位」（下記式2）がβ1,4グリコシド結合して繰り返してなる構造を基本骨格（これを以下「ヘパリン骨格」とも記載する）とする多糖

であり、硫酸化グリコサミノグリカンの1種である。これまで、「ヘパリン」及び「ヘパラン硫酸」の硫酸基は、下記式2中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、又は $R_4$ の位置に結合することは知られていたが、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、及び $R_4$ の全てが硫酸基( $SO_2^-$ )であるグリコサミノグリカンとその製造方法は知られていなかった。

【0004】

【化4】



【0005】

一方、ヘパリン骨格を有するグリコサミノグリカンは様々な生理活性を有することが一般に知られている。例えばヘパリンは血液に対し抗凝固活性を示すことが古くから知られており (Thromb. Res., 75(1994), 1-32)、また各種成長因子と親和性を有して成長因子の活性化に働くことが知られている (Glycobiology, 4(1994), p.451)。ヘパラン硫酸も各種成長因子との親和性を有しており成長因子を活性化させて創傷治癒の促進に働くこと (J. Phthol., 183(1997), 251-252) 等が知られている。またヘパリンの構成糖であるGlcNの6位に結合した硫酸基のみを特異的に脱硫酸化することで得られる6脱硫酸化ヘパリンは、血液に対する抗凝固活性は失っているが創傷治癒を促進する働きを有していることが知られており (W000/06608)、また過ヨウ素酸酸化還元処理とHexAの2位の特異的な脱硫酸化とを組み合わせ得られる過ヨウ素酸酸化還元2-O-脱硫酸化ヘパリン (主にヘパリン骨格を維持している) は各種成長因子の安定化及び神経成長の促進に働くことが知られている (特開平11-310602)。

これらの事実から、ヘパリン骨格を有する多糖は様々な生理活性を有すると考えられ、ヘパリンの誘導体は極めて多くの可能性を有していると考えられている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

従って、「ヘパリン骨格を有する糖鎖が有する新たな生理活性」を探るためにも、新たな「ヘパリン骨格を有する多糖又はオリゴ糖」の調製が期待されている。

## 【0007】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者等は上記課題の解決のために鋭意検討した結果、特定の硫酸基転移酵素を使用することで、これまでに知られていなかった構造を含むグリコサミノグリカンが得られることを見出し、本発明を完成させた。

## 【0008】

すなわち、本発明は以下の構成からなる。

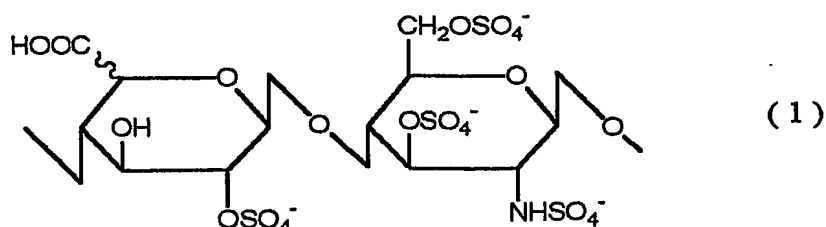
本発明の第一の要旨は「下記（a）又は（b）記載のポリペプチドを含むことを特徴とする、下記式1記載の構造を含むグリコサミノグリカンの合成のための酵素剤」である。

（a）配列番号2記載のアミノ酸配列中のアミノ酸番号37乃至346からなるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

（b）配列番号2記載のアミノ酸配列中のアミノ酸番号37乃至346からなるアミノ酸配列に、1又は複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入若しくは転移を有するアミノ酸配列を含むと共に、硫酸基受容体であるヘパリン又はヘパラン硫酸に対して、硫酸基供与体から硫酸基を転移して、下記式1記載の構造を含むグリコサミノグリカンを生成する活性を有するポリペプチド。

## 【0009】

## 【化5】



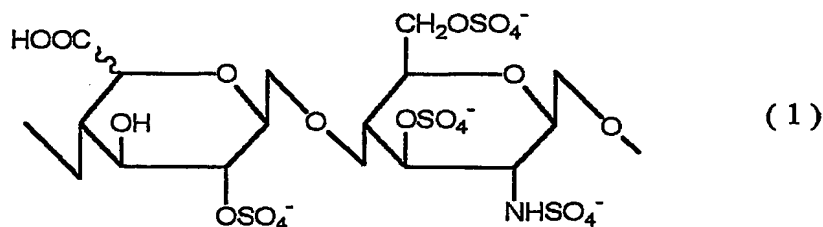
## 【0010】

本発明の第二の要旨は「ヘパリン又はヘパラン硫酸に、前記酵素剤を作用させて、硫酸基供与体から硫酸基を転移して、下記式1記載の構造を含むグリコサミ

ノグリカンを生成することを特徴とする下記式 1 記載の構造を含むグリコサミノグリカンの製造方法」である。

【0 0 1 1】

【化 6】



【0 0 1 2】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を発明の実施の形態により詳説する。

(1) 本発明酵素剤

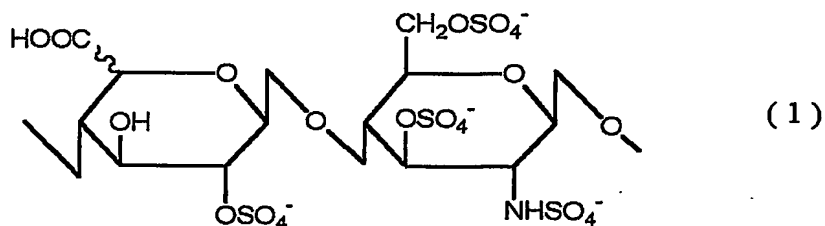
本発明酵素剤は「下記 (a) 又は (b) 記載のポリペプチドを含むことを特徴とする、下記式 1 記載の構造を含むグリコサミノグリカンの合成のための酵素剤」である。

(a) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列中のアミノ酸番号 3 7 乃至 3 4 6 からなるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(b) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列中のアミノ酸番号 3 7 乃至 3 4 6 からなるアミノ酸配列に、1 又は複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入若しくは転移を有するアミノ酸配列を含むと共に、硫酸基受容体であるヘパリン又はヘパラン硫酸に対して、硫酸基供与体から硫酸基を転移して、下記式 1 記載の構造を含むグリコサミノグリカン生成する活性を有するポリペプチド。

【0 0 1 3】

【化 7】



【0 0 1 4】



本発明酵素剤における「配列番号 2 記載のアミノ酸配列中のアミノ酸番号 3 7 乃至 3 4 6 からなるアミノ酸配列を含むポリペプチド」は、「ヘパリン及びヘパラン硫酸に対して、硫酸基供与体から硫酸基を転移して、下記式 1 記載の構造を含むグリコサミノグリカンを生成する活性」（以下「本硫酸基転移酵素活性」とも記載する）を有する酵素のポリペプチドであり、本発明酵素剤の「活性成分であるポリペプチドのアミノ酸配列」としてこのような「ポリペプチドのアミノ酸配列」が含まれることが好ましい。このようなポリペプチドの例としては例えば下記（a'）及び（a''）が例示される。

（a'）配列番号 2 記載のアミノ酸配列中のアミノ酸番号 3 7 乃至 3 4 6 からなるアミノ酸配列からなるポリペプチド

（a''）配列番号 2 記載の全アミノ酸配列からなるポリペプチド

【0015】

このポリペプチドを総称して以下「SFT-1ポリペプチド」と記載する。

一般にアミノ酸配列に 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は転移等の変異が存在していても、酵素の活性が維持されることは当業者にとっては理解されうるところであり、上記（a）、（a'）、（a''）記載の SFT-1 ポリペプチドのアミノ酸配列に於いても同様である。すなわち、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は転移等の変異が存在していても「本硫酸基転移酵素活性」を有する限りに於いて上記本発明酵素剤の活性成分である「ポリペプチド」として使用することができる。

【0016】

天然に存在するポリペプチドには、それをコードする DNA の多型や変異の他、生成後のポリペプチドの細胞内及び精製中の修飾反応などによってそのアミノ酸配列中にアミノ酸の置換、欠失、挿入又は転移等の変異が起こりうるが、それにも拘わらず変異を有しないポリペプチドと実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように構造的に若干の相違があってもその機能については大きな違いが認められないものも、上記「ポリペプチド」に包含される。人為的にポリペプチドのアミノ酸配列に上記の様な変異を導入した場合も同様であり、この場合には更に多種多様の「変異を有するポリペプチド」

を作成することが可能である。例えば、ヒトインターロイキン2 (IL-2) のアミノ酸配列中の、あるシステイン残基をセリン残基に置換したポリペプチドがIL-2の活性を保持することが知られている (Science, 224(1984), p.1431)。またある種のポリペプチドは、活性には必須でないペプチド領域を有していることが知られている。例えば、細胞外に分泌されるポリペプチドに存在するシグナルペプチドや、プロテアーゼの前駆体等に見られるプロ配列などがこれに当たり、これらの領域のほとんどは翻訳後、又は活性型ポリペプチドへの転換に際して除去される。このようなポリペプチドは、一次構造上は異なった形で存在しているが、最終的には同等の機能を有するポリペプチドであり、本発明酵素剤の活性成分として含まれる「ポリペプチド」にもそのような「活性には必須でないペプチド領域を含むポリペプチド」が包含される。「部位特異的変異法」などの公知の方法によりこのような変異を有するポリペプチドを容易に作成することが可能である。

#### 【0017】

なお、ここで「数個」とは、「本硫酸基転移酵素活性」を有する限りに於いて特に限定はされないが、好ましくは全アミノ酸数の10%以下、最も好ましくは5%以下程度のアミノ酸数を示す。例えば310個のアミノ酸からなるポリペプチド（例えば上記 (a') のポリペプチド）に於いては好ましくは31個以下、最も好ましくは16個以下を示し、また346個のアミノ酸からなるポリペプチド（例えば上記 (a'') のポリペプチド）に於いては好ましくは34個以下、最も好ましくは17個以下を示す。

#### 【0018】

なお、上述した「本硫酸基転移酵素活性」は、例えば放射能 ( $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{H}$  (トリチウム) 等) や蛍光物質等の標識物質 (基質に立体傷害などを起こさないことから放射能が好ましい) で標識した「硫酸基供与体」を用い、ヘパリン又はヘパラン硫酸を「硫酸基受容体」として用いて緩衝液中で20乃至40℃条件下で酵素反応を行なって、「硫酸基受容体」が標識物質で標識されるか否かを調べることで検出することができる。「硫酸基受容体」の標識の有無は、例えば酵素反応後の反応溶液をゲル濾過又は高速液体クロマトグラフィー (以下「HPLC」とも略記する

）等の分離手段と、標識物質を検出する手段（標識物質として放射能を用いる場合にはシンチレーションカウンター又はオートラジオグラフィー等の放射能検出手段、標識物質として蛍光物質を用いる場合には蛍光検出器による検出等の蛍光を検出する手段）とを組み合わせることで、容易に確認することが可能である。

## 【0019】

また、本発明酵素剤における「硫酸基供与体」としては、「硫酸基受容体に対して硫酸基を転移することが可能な物質」であれば特に限定はされないが、一般的に生体内で硫酸基供与体として働いていることが知られている3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸（活性硫酸：以下「PAPS」とも略記する）が好ましい。

## 【0020】

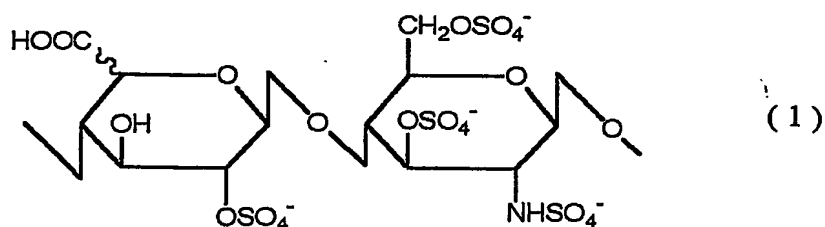
なお、「本発明酵素剤」は、活性成分である「SFT-1ポリペプチド」の他に、例えばSFT-1ポリペプチドを保持する担体（セルロースゲル、アガロースゲル、シリカゲル、ガラスビーズ等）や、他のポリペプチド（例えば遺伝子工学的に「SFT-1ポリペプチド」を合成する場合に「SFT-1ポリペプチド」との融合タンパク質として発現される識別ペプチド等）或いは糖鎖（例えば遺伝子工学的に「SFT-1ポリペプチド」を合成する場合に組換え体として真核生物由来の細胞を用いると、SFT-1ポリペプチドに糖鎖が付加されることがある）を含んでいても、「SFT-1ポリペプチド」の「本硫酸基転移酵素活性」を妨げない限りにおいて支障はない。

## 【0021】

このような本発明酵素剤は、ヘパリン又はヘパラン硫酸に、「硫酸基供与体」から硫酸基を転移して下記式1記載の構造を含むグリコサミノグリカンの製造方法（本発明製造方法）に使用することができる。

## 【0022】

## 【化8】

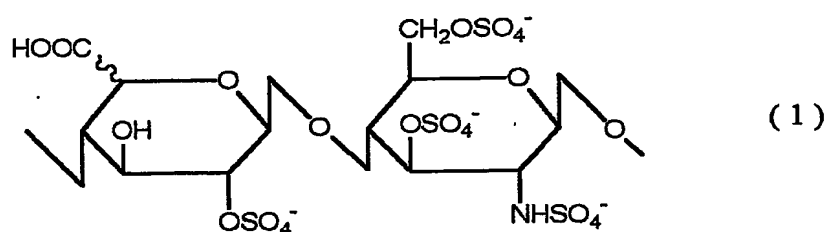


【0023】

本発明製造方法によって得られるグリコサミノグリカンは、「『HexA残基とD-GlcN残基とが1,4グリコシド結合で結合してなる二糖単位』が繰り返して $\beta$ 1,4グリコシド結合してなる構造を基本骨格とすると共に、該基本骨格中に下記式1で示される二糖を含むことを特徴とするグリコサミノグリカン」（本発明製造方法による調製物）である。

【0024】

【化9】

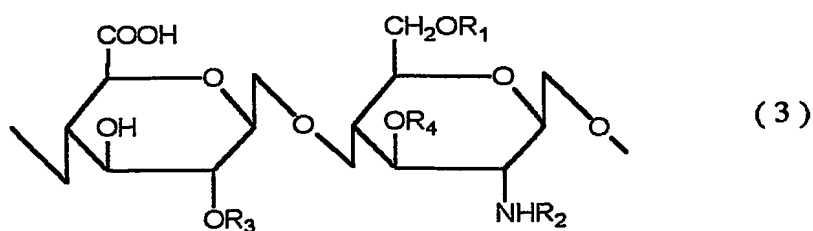


【0025】

「HexA残基」と「GlcN残基」との1,4グリコシド結合は、「HexA残基」が「GlcA残基」の場合には当該結合は $\beta$ 1,4グリコシド結合であり、また「HexA残基」が「IdoA残基」の場合には当該結合は $\alpha$ 1,4グリコシド結合であることが好ましい。ヘパリン及びヘパラン硫酸の基本骨格はこれらのグリコシド結合により形成されているからである。すなわち、上記「本発明製造方法によって得られるグリコサミノグリカン」の基本骨格における「二糖単位」とは下記式3又は4である。

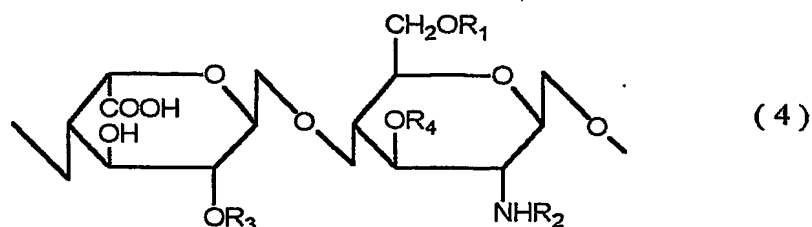
【0026】

【化10】



【0027】

## 【化 1 1】



【0028】

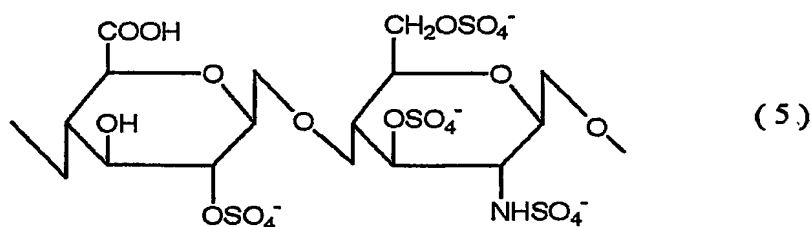
従って、「本発明製造方法による調製物」に含まれる、式1で示される二糖に於ける「HexA」とは、GlcA又はIdoAを示し、何れであっても良い。上述の通り、ヘパリン及びヘパラン硫酸の基本骨格には何れのHexAも基本骨格には含まれているからである。

【0029】

また、上記式1は、上記式3又は4に、本発明酵素剤により硫酸基が転移されて生ずる構造であるから、より具体的には下記式5及び6記載の二糖であり、何れかの二糖が「本発明製造方法による調製物」一分子につき1以上、好ましくは3以上、最も好ましくは5以上含まれている。

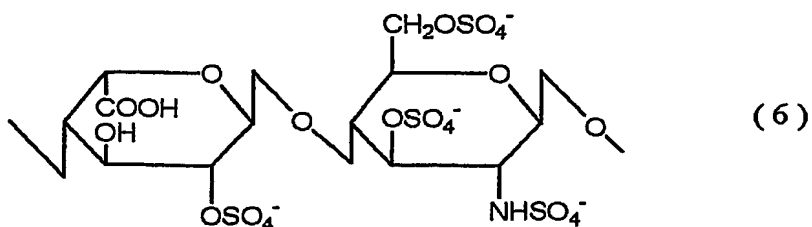
【0030】

## 【化 1 2】



【0031】

## 【化 1 3】



【0032】

ここで、 $R_1$ 、 $R_3$ 、及び $R_4$ は各々独立に水素原子(H)又は硫酸基( $SO_4^-$ )

) であり、 $R_2$  はアセチル基 ( $COCH_3$ ) 又は  $SO_4^-$  である。

【0033】

「本発明製造方法による調製物」は、ヘパリン又はヘパラン硫酸に前記「本発明酵素剤」を作用させて調製されるので、その重量平均分子量は原料として使用したヘパリン及びヘパラン硫酸に近い重量平均分子量である。たとえばゲル濾過によって測定した「本発明製造方法による調製物」の重量平均分子量は、3000乃至30000Da、好ましくは4000乃至27000Da、最も好ましくは5000乃至25000Daである。

【0034】

(2) 本発明酵素剤の製造方法

本発明酵素剤は例えば以下の方法で調製することができる。

【0035】

すなわち、「配列番号2記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA」(例えば配列番号1記載の塩基配列中、塩基番号109乃至1041及び1乃至1041記載の塩基配列からなるDNA等が例示される)を例えばヒトのcDNAライブラリーから常法に従って増幅してクローニングして得た後、当該クローンを組み込んだ組換え体(宿主細胞としては例えば大腸菌などの原核細胞、又は酵母、昆虫、ほ乳類などの真核細胞、好ましくは昆虫細胞又はほ乳類細胞、最も好ましくはほ乳類細胞)を生育させ、得られた培養物(培養細胞、培養上清、組換え体を導入した生体、その排泄物、分泌物等)から「SFT-1ポリペプチド」を分離して「本発明酵素剤」を製造することができる。なお、上記クローンを、例えばFLAG、プロテインA等の通常用いられる標識ペプチドと「SFT-1ポリペプチド」との融合タンパク質として発現するように構築することで、上記培養物からの「SFT-1ポリペプチド」の精製がより容易となる。すなわち「SFT-1ポリペプチド」を上記識別ペプチドとの融合タンパク質として発現させた場合には、識別ペプチドに対する抗体を使用して融合タンパク質の精製を行ない「本発明酵素剤」を得ることが可能である。また更に上記の抗体を固相化したアフィニティー担体を用いることで、融合タンパク質が結合したゲルを容易に調製することが可能であり、このようなゲルはそのまま上述の「本発明酵素剤」として使用することが可能である。

【 0 0 3 6 】

## 【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

(調製例) SFT-1ポリペプチドの調製

1. 遺伝子データベースの検索とSFT-1ポリペプチドをコードする遺伝子の塩基配列決定

既知のヒト由来のヘパラン硫酸3-O-スルホトランスフェラーゼ (HS30ST) 遺伝子を用いて、遺伝子データベースから類似遺伝子の検索を行なった。用いたHS30ST遺伝子とはGenBank Accession No.AF019386の遺伝子である。また、検索は、Blast (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215, 402-410(1990)) を用いた。

【 0 0 3 7 】

その結果、ゲノム配列GeneBank Accession No.AL355498の中に類似した配列が見いだされ、HS30ST遺伝子に相同性を有する新規遺伝子が同定された。遺伝子解析プログラム (GENSCAN: スタンフォード大学製) によってこの新規遺伝子は2つのエクソンによってコードされていることが予測された。

【 0 0 3 8 】

(1-1) 本発明ポリペプチドのコード領域の確認

Human Kidney Marathon-Ready cDNA (CLONTECH社製) を用い、付属のAP1プライマーと (cDNA断片の両側にAP1、AP2のアダプターがついている)、第2エクソンの5'末端付近の配列部分に設定したプライマー (GP-226: 配列番号3) でPCR (94℃5秒、68℃4分を35サイクル) を行なった。さらにMarathon cDNA付属のAP2プライマーと配列部分に設定したプライマー (GP-224: 配列番号4) でnested PCR (94℃5秒、68℃4分を40サイクル) を行なった。その結果得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動に供し、約450bのバンドをGel Extraction Kit (キアゲン社製) を用いて回収した。得られたDNA断片の塩基配列を常法により解析した結果、第1エクソンの配列 (N-末端の36アミノ酸がコードされていた) に続き第2エクソンの配列が確認された。これは遺伝子解析プログラムによって予測されたものと同じであった。従って、SFT-1ポリペプチドのコード領域は第1エクソンと第2エクソンを結合した配列番号1に示す配列であることが確認された。

## 【 0 0 3 9 】

## ( 1 - 2 ) 第 2 エクソンのクローニング

上記の結果から第 1 エクソンにコードされているのは N-末端の 36 アミノ酸だけであり、第 2 エクソンが SFT-1 ポリペプチドの大部分をコードしていることが明らかとなった。従って、活性領域を含む酵素の主要部分は第 2 エクソン中に含まれていると予測された (第 2 エクソンにコードされた SFT-1 ポリペプチドの領域を便宜的に SFT-1 ポリペプチド 1 と記載し、第 2 エクソンの領域の DNA を SFT-1 (1) と記載する)。そこで遺伝子 DNA を鋳型として SFT-1 (1) のクローニングを行なった。

## 【 0 0 4 0 】

Human Genomic DNA (CLONTECH 社製) を鋳型として SFT-1 (1) を含む領域を PCR 法 (94℃ 15 秒、50℃ 30 秒、68℃ 1 分を 35 サイクル) で増幅した。使用したプライマーは SFT-1 (1) の上流部分 (SFTex2F : 配列番号 5) と停止コドンの下流部分 (SFTex2R : 配列番号 6) のゲノム配列に設定した。得られた約 1kb の断片を常法により精製し、塩基配列を解析した結果、SFT-1 (1) の配列を得られていることを確認した。

## 【 0 0 4 1 】

## 2. SFT-1 (1) の発現ベクターへの組込み

遺伝子の発現系を作成するため、まず上記で得られた SFT-1 (1) をインビトロジェン社製の Gateway システムの発現ベクター pDONR201 に組込み、さらにインビトロジェン社製の Bac-to-Bac システムによる Bacmid を作成した。

## 【 0 0 4 2 】

## ( 2 - 1 ) 新規硫酸基転移酵素のエントリークローンの作製

( 1 - 2 ) で SFT-1 (1) を増幅して得られた PCR 産物を鋳型として、再度 PCR (94℃ 15 秒、68℃ 3 分を 30 サイクル) を行ない Gateway システム用の DNA 断片を得た。使用したプライマーは SFT-1 (1) の 5' 末端近くの配列と停止コドン付近の配列に Gateway システム用の配列を付加した 5' プライマー (SFTgateF2 : 配列番号 7) 及び 3' プライマー (SFTgateRstop : 配列番号 8) である。常法により精製した上記 DNA 断片を用い、BP クロナーゼ反応によって pDONR201 へ組み込み、エントリークロ



ーンを作成した。反応は上記DAN断片 $1\mu\text{l}$ 、pDONR201を $1\mu\text{l}$  (150ng)、反応緩衝液 $2\mu\text{l}$ 、トリス-エチレンジアミン四酢酸(EDTA)緩衝液(以下「TE」とも略記する)  $4\mu\text{l}$ 、BPクロナーゼミックス $2\mu\text{l}$ を $25^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートして行なった。プロテイナーゼKを $1\mu\text{l}$ 加えて $37^{\circ}\text{C}$ で10分保って反応を停止した。

## 【0043】

その後上記反応液 $5\mu\text{l}$ をコンピテントセル(大腸菌DH5 $\alpha$ )  $100\mu\text{l}$ と混合し、ヒートショック法による形質転換の後、カナマイシンを含むLBプレートにまいた。翌日コロニーを回収し、カナマイシンを含むLB培地3mlで培養した後、QIAprep Spin Miniprep Kit(キアゲン社製)によりプラスミドを抽出精製した。得られたプラスミドの一部を使って常法により塩基配列を測定し、目的とするDNAが組み込まれていることを確認した。

## 【0044】

## (2-2) 発現クローンの作成

上記エントリークローンは挿入部位の両側に $\lambda$ ファージが大腸菌から切り出される際の組換部位となるattLを持つもので、LRクロナーゼ( $\lambda$ ファージの組換酵素Int、IHF、Xisを混合したもの)とデステイネーションベクターとを混合することで、挿入部位がデステイネーションベクターに移り、発現クローンが作成される。具体的工程は以下の通りである。

## 【0045】

まずエントリークローン $1\mu\text{l}$ 、pFBIFを $0.5\mu\text{l}$  (75ng)、LR反応緩衝液 $2\mu\text{l}$ 、TE  $4.5\mu\text{l}$ 、LRクロナーゼミックス $2\mu\text{l}$ を $25^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させ、プロテイナーゼKを $1\mu\text{l}$ 加えて $37^{\circ}\text{C}$ で10分間インキュベートして反応を終了させた(この組換反応でpFBIF-SFT-1(1)が精製される)。pFBIFはpFastBac1にIg $\kappa$ シグナル配列(配列番号9)及びFLAGペプチド(配列番号10)を挿入したもので、OT3(配列番号11)を鋳型とし、プライマーOT20(配列番号12)とOT21(配列番号13)によって得られたDNA断片を上記と同様にBamHIとEcoRI部位に挿入し、Gateway配列を挿入するため、Gateway Vector Conversion System(インビトロジェン社製)を用いてConversion cassetteを挿入した。Ig $\kappa$ シグナル配列は発現タンパク質を分泌型にするため、FLAGタグは生成を容易とするために挿入した。

## 【0046】

その後上記反応液5 $\mu$ lをコンピテントセル（大腸菌DH5 $\alpha$ ）50 $\mu$ lと混合し、ヒートショック法による形質転換の後、アンピシリンを含むLBプレートにまいた。翌日コロニーをとり、アンピシリンを含むLB培地5mlで培養した後、QIAprep Spin Miniprep Kit（キアゲン社製）によりプラスミド（pFBIF-SFT-1(1)）を抽出精製した。得られたプラスミドの一部を使って常法により塩基配列を測定し、目的とするDNAが組み込まれていることを確認した。

## 【0047】

## (2-3) Bac-to-BacシステムによるBacmidの作成

続いてBac-to-Bacシステム（インビトロジェン社製）を用いて上記pFBIF-SFT-1(1)とpFastBacとの間で組換えを行い、昆虫細胞中で増殖可能なBacmidにSFT-1(1)の配列を挿入した。このシステムはTn7の組換え部位を利用して、Bacmidを含む大腸菌（E. coli DH10BAC）に目的遺伝子を挿入させたpFastBacを導入するだけで、ヘルパープラスミドから産生される組換えタンパク質によって目的とする遺伝子がBacmidへ取り込まれるシステムである。またBacmidにはlacZ遺伝子が含まれており、古典的なコロニーの色（青（挿入なし）－白（挿入あり））による選択が可能である。

## 【0048】

すなわち、上記精製ベクター（pFBIF-SFT-1(1)）をコンピテントセル（大腸菌DH10BAC）50 $\mu$ lと混合し、ヒートショック法による形質転換の後、カナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、5-ブロモインドリル $\beta$ -D-ガラクトピラノシド（Blue-gal）、及びイソプロピル $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド（IPTG）を含むLBプレートにまき翌日白い単独コロニーを回収してそれをさらに培養し、Bacmidを回収した。

## 【0049】

## 3. Bacmidの昆虫細胞への導入とSFT-1ポリペプチド1の回収

上記白いコロニーから得られたBacmidを昆虫細胞Sf21（インビトロジェン社製）に導入した。すなわち35mmのシャーレにSf21細胞が $9 \times 10^5$ 個/2mlの抗生物質を含むSf-900IISFM（インビトロジェン社製）となるように添加し、27℃で1時間

培養して細胞を接着させた。溶液A（精製したBacmid DNA  $5\mu\text{l}$  に抗生物質を含まないSf-900IISFMを $100\mu\text{l}$  加えた溶液）と、溶液B（CellFECTIN溶液（インビトロジェン社製） $6\mu\text{l}$  に抗生物質を含まないSf-900IISFM  $100\mu\text{l}$  を加えた溶液）とを丁寧に混合して「lipid-DNA complexes溶液」を調製し、15～45分間、室温でインキュベートした。細胞が接着したことを確認して、培養液を吸引して抗生物質を含まないSf-900IISFMを2ml添加した。その後、「lipid-DNA complexes溶液」に抗生物質を含まないSf900IISFM  $800\mu\text{l}$  を加えて丁寧に混和し、細胞から培養液を吸引して、希釈した「lipid-DNA complexes溶液」を細胞に加え、 $27^{\circ}\text{C}$  で5時間インキュベーションした。その後、トランスフェクション混合物を除き、抗生物質を含むSf-900IISFM培養液2mlを加えて72時間後にピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを $1,200\times g$  で10分間遠心処理し、上清を別のチューブに保存した（これを一次ウイルス液とした）。

## 【0050】

T75培養フラスコにSf21細胞 $6\times 10^6$  個/ $15\text{ml}$  Sf-900IISFM（インビトロジェン社製）（抗生物質を含む）を入れ、一次ウイルス液を1ml添加し、 $27^{\circ}\text{C}$  で96時間培養した。培養後、ピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを $1,200\times g$  で10分間遠心処理し、上清をチューブに保存した（これを二次ウイルス液とした）。

## 【0051】

更に、T75培養フラスコにSf21細胞 $6\times 10^6$  個/ $15\text{ml}$  Sf-900IISFM（インビトロジェン社製）（抗生物質を含む）を入れ、二次ウイルス液を1ml添加し、 $27^{\circ}\text{C}$  で72時間培養した。培養後、ピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを $1,200\times g$  で10分間遠心処理し、上清をチューブに保存した（これを三次ウイルス液とした）。

## 【0052】

また更に、100ml用スピナーフラスコにSf21細胞 $6\times 10^5$  個/ml濃度で100mlを入れ、三次ウイルス液を1ml添加して $27^{\circ}\text{C}$  で約96時間培養した。培養後に、細胞及び培養液を回収した。これを $1,200\times g$  で10分間遠心処理し、上清を回収した。

## 【0053】

この培養上清10mlにアジ化ナトリウム、塩化ナトリウム及び塩化カルシウムを加え、終濃度をアジ化ナトリウムを0.05%、塩化ナトリウムを150mM、塩化カルシウムを2mMとした。抗FLAG抗体吸着ゲル (Anti-Flag M1 monoclonal antibody Agarose Affinity Gel, シグマ社製) 50  $\mu$ lを加えて12時間静かに攪拌した。遠心分離 (1,000 $\times$ g、3分、4 $^{\circ}$ C) して上清を除去した後、1mMの塩化カルシウムを含むトリス緩衝生理的食塩水 (TBS) で3回洗浄した。これを遠心分離 (1,000 $\times$ g、3分、4 $^{\circ}$ C) して余分な洗浄液を除き融合タンパク質 (SFT-1ポリペプチド1-FLAG) が結合したゲルを得、これを本発明酵素剤1とした。

【0054】

#### 4. SFT-1ポリペプチド1-FLAGの確認

上記で得た本発明酵素剤1 (5  $\mu$ l) を使い、ペルオキシダーゼ標識抗FLAG抗体 (Anti-FLAG M2 Peroxydase, シグマ社製) を用いて常法に従ってウエスタンブロッティングを行ない、培養上清中に発現しているSFT-1ポリペプチド1とFLAGタンパク質とからなる融合タンパク質が回収精製されていることを確認した。

【0055】

#### 実施例1：本発明酵素剤1によるヘパリンの修飾

本発明酵素剤1を用いてヘパリンの硫酸化反応を行なった。反応溶液は50mMイミダゾール塩酸緩衝液 (pH6.8) 150  $\mu$ l中に、プロタミン塩酸 11  $\mu$ g、ヘパリン (シグマ社製) 0.3mg、 $[^{35}\text{S}]$ -PAPS ( $2.3 \times 10^7$  dpm: パーキンエルマー社製) および本発明酵素剤1 (20  $\mu$ l) を含む。37 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートした後、70%エタノール沈殿を2回行なってヘパリンを回収した。室温に放置してエタノールを蒸発させ、ヘパリン分解酵素反応用緩衝液30  $\mu$ l (20mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0: 2mM酢酸カルシウムを含む)) に溶解した後、ヘパリン分解酵素 (ヘパリナーゼ150mU (生化学工業株式会社製)、ヘパリチナーゼI 90mU (生化学工業株式会社製) 及びヘパリチナーゼII 60mU (生化学工業株式会社製)) : これらの酵素はヘパリン骨格中のGlcNとウロン酸 (HexA) との $\beta$ 1,4グリコシド結合部分 (GlcN $\beta$ 1,4HexA) を加水分解して、不飽和ウロン酸 ( $\Delta$ HexA) とGlcNが1,4グリコシド結合した不飽和二糖 ( $\Delta$ HexA1,4GlcN) を生ずる) を加えて37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。その後、100 $^{\circ}$ Cで1分間加熱して反応を停止し、ポアサ

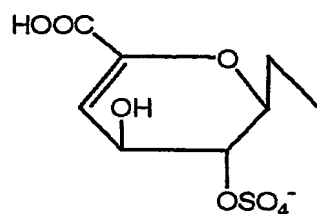
イズ0.22 $\mu$ mのフィルター（ミリポア社製）でろ過した後、HPLCで分離した。使用したカラムはCarboPac PA1（4×250mm：ダイオネクス社製）、CarboPac PA1ガードカラム（ダイオネクス社製）、流速 0.8ml/min、カラム温度40℃の条件下で、0-5-8-15-20-28-40分の溶出時間に対して1-6-19-38-70-76-76%の3Mリチウム塩酸で濃度勾配により溶出した。溶出液を0.2mlずつ分取し、そのうち10 $\mu$ lをシンチレーションカウンターで分析して放射能の溶出位置を確認した（図1）。その結果、保持時間30分に強い放射能を有するピークが現れた。

#### 【0056】

そこで保持時間30分に現れたピークを回収し、セルロファインG25sfカラム（1×24cm：生化学工業株式会社販売）で脱塩した。脱塩した試料を凍結乾燥器で0.1mlに濃縮して「濃縮試料」とした。「濃縮試料」の2 $\mu$ lを $\Delta$ 4,5-グルクロン酸-2-スルファターゼ（不飽和ウロン酸残基の2位硫酸エステルを特異的に加水分解して脱硫酸化する酵素：Eur. J. Biochem, 145(1984), 607-615の方法に従って精製した）で消化した。反応溶液は20mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH6.5：0.15%ウシ血清アルブミン、ヘパリン二脱硫酸化酵素4.1mUを含む）5mlを使用した。37℃で2時間反応させた後、100℃で1分間加熱して反応を停止した。蒸留水18 $\mu$ lを加えてポアサイズ0.22 $\mu$ mのフィルター（ミリポア社製）でろ過し、上記と同じ条件でHPLCで分離した（図2）。その結果、ヘパリン二脱硫酸化酵素で消化していない対照では、保持時間約30.5分にピークが認められた（図2A）が、 $\Delta$ 4,5-グルクロン酸-2-スルファターゼで処理した濃縮試料で、ピークの保持時間が約22分に移動していた（図2B）。すなわち、不飽和ウロン酸の2位硫酸基を特異的に脱硫酸化する酵素で処理してピークの移動が観察されたことから、濃縮試料に含まれる不飽和二糖には下記式7の $\Delta$ HexA(2S)構造が含まれることが確認された。

#### 【0057】

【化 14】



(7)

【0058】

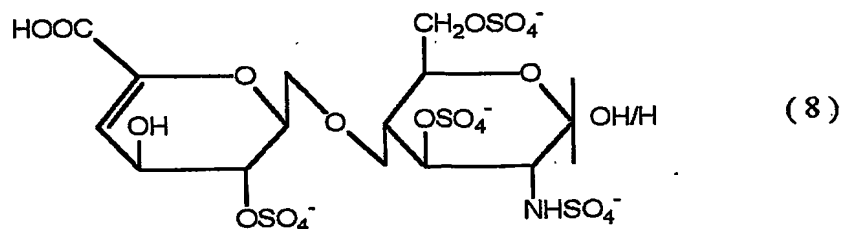
次に、上記「濃縮試料」のうち $2\mu\text{l}$ を70mM酢酸水銀 (pH5.0)  $2\mu\text{l}$ と混合して室温で10分間放置することにより不飽和ウロン酸を除去し（この反応により不飽和二糖中の不飽和ウロン酸のみが特異的に分解される：Biochem. J., 245(1987), 795-804）、1M炭酸ナトリウム緩衝液 (pH9.0)  $2\mu\text{l}$ 及び0.5Mテトラヒドロほう酸ナトリウム (0.1M水酸化ナトリウム溶液)  $2\mu\text{l}$ を加え、50℃で30分インキュベートして還元反応を行なった後、上記と同じ条件でHPLCで分離を行なった（図3）。不飽和ウロン酸を分解した後の「濃縮試料」の溶出パターン（図3A）と、 $^3\text{H}$ テトラヒドロほう酸ナトリウムによる還元反応でラベルした標準品（GlcN(NS,3S): 14分近辺のピーク1、GlcN(NS,3S,6S): 22～23分近辺のピーク2）の溶出パターン（図3B）とを対比すると、試料の保持時間はGlcN(NS,3S,6S)のもの（ピーク2）と一致していた。このことから、不飽和ウロン酸を分解した後の「濃縮試料」は2位アミノ基、3位ヒドロキシル基、及び6位ヒドロキシル基が硫酸化されているGlcNであることが明かとなった。

【0059】

図2及び図3の結果から、濃縮試料に含まれていた不飽和二糖は下記式8に示す不飽和二糖（ $\Delta\text{HexA}(2\text{S})-\text{GlcN}(\text{NS},3\text{S},6\text{S})$ ）であったことが確認され、ヘパリン分解酵素で分解をする前のグリコサミノグリカンには、上記式1で示される構造が含まれていたことが示された。

【0060】

【化 1 5】



【 0 0 6 1 】

上記と同様の硫酸化反応条件によって本発明酵素剤 1 でヘパラン硫酸（シグマ社製）を硫酸化し、上記同様にヘパリン分解酵素で消化した試料をHPLCで分離したところ、ヘパリンに比べて生成量は少ないが、保持時間約30.5分にピークが検出された（図4 矢印で示したピーク）。これはヘパリンで確認された  $\Delta$ HexA(2S) - GlcN(NS,3S,6S)と同じ保持時間であることから、ヘパラン硫酸を硫酸基受容体にした場合にも上記式 1 で示される構造を含むグリコサミノグリカンが生成していたことが明かとなった。

【 0 0 6 2 】

【配列表】

## Sequence Listing

<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY  
SEIKAGAKU CORPORATION

<120> Novel glycosaminoglycan, a method for synthesize the same, and a  
reagent for modify polysaccharide

<130> J200202600

<140>

<141>

<160> 13

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1041

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1041)

&lt;400&gt; 1

atg cta ttc aaa cag cag gcg tgg ctg aga cag aag ctc ctg gtg ctg 48

Met Leu Phe Lys Gln Gln Ala Trp Leu Arg Gln Lys Leu Leu Val Leu

1

5

10

15

gga agc ctt gcc gtt ggg agt ctc ctg tat cta gtc gcc aga gtt ggg 96

Gly Ser Leu Ala Val Gly Ser Leu Leu Tyr Leu Val Ala Arg Val Gly

20

25

30

agc ttg gat agg cta caa ccc att tgc ccc att gaa ggt cga ctg ggt 144

Ser Leu Asp Arg Leu Gln Pro Ile Cys Pro Ile Glu Gly Arg Leu Gly

35

40

45

gga gcc cgc act cag gct gaa ttc cca ctt cgc gcc ctg cag ttt aag 192

Gly Ala Arg Thr Gln Ala Glu Phe Pro Leu Arg Ala Leu Gln Phe Lys

50

55

60

cgt ggc ctg ctg cac gag ttc cgg aag ggc aac gct tcc aag gag cag 240

Arg Gly Leu Leu His Glu Phe Arg Lys Gly Asn Ala Ser Lys Glu Gln



65

70

75

80

gtt cgc ctc cat gac ctg gtc cag cag ctc ccc aag gcc att atc att 288

Val Arg Leu His Asp Leu Val Gln Gln Leu Pro Lys Ala Ile Ile Ile

85

90

95

ggg gtg agg aaa gga ggc aca agg gcc ctg ctt gaa atg ctg aac cta 336

Gly Val Arg Lys Gly Gly Thr Arg Ala Leu Leu Glu Met Leu Asn Leu

100

105

110

cat ccg gca gta gtc aaa gcc tct caa gaa atc cac ttt ttt gat aat 384

His Pro Ala Val Val Lys Ala Ser Gln Glu Ile His Phe Phe Asp Asn

115

120

125

gat gag aat tat ggt aag ggc att gag tgg tat agg aaa aag atg cct 432

Asp Glu Asn Tyr Gly Lys Gly Ile Glu Trp Tyr Arg Lys Lys Met Pro

130

135

140

ttt tcc tac cct cag caa atc aca att gaa aag agc cca gca tat ttt 480

Phe Ser Tyr Pro Gln Gln Ile Thr Ile Glu Lys Ser Pro Ala Tyr Phe

145

150

155

160

atc aca gag gag gtt cca gaa agg att tac aaa atg aac tca tcc atc 528

Ile Thr Glu Glu Val Pro Glu Arg Ile Tyr Lys Met Asn Ser Ser Ile

165

170

175

aag ttg ttg atc att gtc agg gag cca acc aca aga gct att tct gat 576

Lys Leu Leu Ile Ile Val Arg Glu Pro Thr Thr Arg Ala Ile Ser Asp

180

185

190

tat act cag gtg cta gag ggg aag gag agg aag aac aaa act tat tac 624

Tyr Thr Gln Val Leu Glu Gly Lys Glu Arg Lys Asn Lys Thr Tyr Tyr

195

200

205

aag ttt gag aag ctg gcc ata gac cct aat aca tgc gaa gtg aac aca 672

Lys Phe Glu Lys Leu Ala Ile Asp Pro Asn Thr Cys Glu Val Asn Thr

210

215

220

aaa tac aaa gca gta aga acc agc atc tac acc aaa cat ctg gaa agg 720

Lys Tyr Lys Ala Val Arg Thr Ser Ile Tyr Thr Lys His Leu Glu Arg

225

230

235

240

tgg ttg aaa tac ttt cca att gag caa ttt cat gtc gtc gat gga gat 768

Trp Leu Lys Tyr Phe Pro Ile Glu Gln Phe His Val Val Asp Gly Asp

245

250

255

cgc ctc atc acg gaa cct ctg cca gaa ctt cag ctc gtg gag aag ttc 816

Arg Leu Ile Thr Glu Pro Leu Pro Glu Leu Gln Leu Val Glu Lys Phe

260

265

270

cta aat ctg cct cca agg ata agt caa tac aat tta tac ttc aat gct 864

Leu Asn Leu Pro Pro Arg Ile Ser Gln Tyr Asn Leu Tyr Phe Asn Ala

275

280

285

acc aga ggg ttt tac tgc ttg cgg ttt aat att atc ttt aat aag tgc 912

Thr Arg Gly Phe Tyr Cys Leu Arg Phe Asn Ile Ile Phe Asn Lys Cys

290

295

300

ctg gcg ggc agc aag ggg cgc att cat cca gag gtg gac ccc tct gtc 960

Leu Ala Gly Ser Lys Gly Arg Ile His Pro Glu Val Asp Pro Ser Val

305 310 315 320

att act aaa ttg cgc aaa ttc ttt cat cct ttt aat caa aaa ttt tac 1008

Ile Thr Lys Leu Arg Lys Phe Phe His Pro Phe Asn Gln Lys Phe Tyr

325 330 335

cag atc act ggg agg aca ttg aac tgg ccc taa 1041

Gln Ile Thr Gly Arg Thr Leu Asn Trp Pro

340 345

<210> 2

<211> 346

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Phe Lys Gln Gln Ala Trp Leu Arg Gln Lys Leu Leu Val Leu

1 5 10 15

Gly Ser Leu Ala Val Gly Ser Leu Leu Tyr Leu Val Ala Arg Val Gly

20 25 30

Ser Leu Asp Arg Leu Gln Pro Ile Cys Pro Ile Glu Gly Arg Leu Gly

35 40 45

Gly Ala Arg Thr Gln Ala Glu Phe Pro Leu Arg Ala Leu Gln Phe Lys

50 55 60

Arg Gly Leu Leu His Glu Phe Arg Lys Gly Asn Ala Ser Lys Glu Gln

65 70 75 80

Val Arg Leu His Asp Leu Val Gln Gln Leu Pro Lys Ala Ile Ile Ile

85

90

95

Gly Val Arg Lys Gly Gly Thr Arg Ala Leu Leu Glu Met Leu Asn Leu

100

105

110

His Pro Ala Val Val Lys Ala Ser Gln Glu Ile His Phe Phe Asp Asn

115

120

125

Asp Glu Asn Tyr Gly Lys Gly Ile Glu Trp Tyr Arg Lys Lys Met Pro

130

135

140

Phe Ser Tyr Pro Gln Gln Ile Thr Ile Glu Lys Ser Pro Ala Tyr Phe

145

150

155

160

Ile Thr Glu Glu Val Pro Glu Arg Ile Tyr Lys Met Asn Ser Ser Ile

165

170

175

Lys Leu Leu Ile Ile Val Arg Glu Pro Thr Thr Arg Ala Ile Ser Asp

180

185

190

Tyr Thr Gln Val Leu Glu Gly Lys Glu Arg Lys Asn Lys Thr Tyr Tyr

195

200

205

Lys Phe Glu Lys Leu Ala Ile Asp Pro Asn Thr Cys Glu Val Asn Thr

210

215

220

Lys Tyr Lys Ala Val Arg Thr Ser Ile Tyr Thr Lys His Leu Glu Arg

225

230

235

240

Trp Leu Lys Tyr Phe Pro Ile Glu Gln Phe His Val Val Asp Gly Asp

245

250

255

Arg Leu Ile Thr Glu Pro Leu Pro Glu Leu Gln Leu Val Glu Lys Phe

260

265

270

Leu Asn Leu Pro Pro Arg Ile Ser Gln Tyr Asn Leu Tyr Phe Asn Ala

275

280

285

Thr Arg Gly Phe Tyr Cys Leu Arg Phe Asn Ile Ile Phe Asn Lys Cys

290

295

300

Leu Ala Gly Ser Lys Gly Arg Ile His Pro Glu Val Asp Pro Ser Val

305	310	315	320
Ile Thr Lys Leu Arg Lys Phe Phe His Pro Phe Asn Gln Lys Phe Tyr			
	325	330	335
Gln Ile Thr Gly Arg Thr Leu Asn Trp Pro			
340	345		

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' Primer for  
PCR (GP-226)

<400> 3

cggaactcgt gcagcaggcc acgc

24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for  
PCR (GP-224)

<400> 4

tcgaccttca atggggcaaa tggg

24

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for  
PCR (SFTex2F)

<400> 5

actggggaac cagaaaaatg aaaag

25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for  
PCR (SFTex2R)

<400> 6

gtgtctccag gcacaacaca tagtg

25

<210> 7

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for  
PCR (SFTgateF2)

<400> 7

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cttaagcgt ggcctgctgc acgag 55

<210> 8

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for  
PCR (SFTgateTstop)

<400> 8

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt tagggccagt tcaatgtcct ccc 53

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Ig kappa  
signal sequence

<400> 9

Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly  
20

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: FLAG peptide

<400> 10

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys  
1 5

<210> 11

<211> 94



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: OT3 seuqnce

<400> 11

gatcatgcat tttcaagtgc agattttcag cttcctgcta atcagtcgct cagtcataat 60  
gtcacgtgga gattacaagg acgacgatga caag 94

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: OT20 sequence

<400> 12

cgggatccat gcattttcaa gtgcag 26

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

## &lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: OT21 sequence

&lt;400&gt; 13

ggaattcttg tcacgtcgt ccttg

25

【 0 0 6 3 】

## 【発明の効果】

本発明により、四硫酸化構造を有するヘパリン／ヘパラン硫酸誘導体の製造方法及び酵素剤が提供され、それによりヘパリン／ヘパラン硫酸誘導体の生理活性の探索に大いに貢献することが可能となる。

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】 ヘパリンに対して、本発明酵素剤により、放射能で標識した硫酸基を転移して得られたグリコサミノグリカン、ヘパリン分解酵素で分解して得た分解物を高速液体クロマトグラフィーで分画した際の、各画分における放射能分布を示す図。縦軸は $^{35}\text{S}$ の放射能 ( $\text{dpm} \times 10^{-3}$ ) を示し、横軸は保持時間 (分) を示す。

【図 2】 「濃縮試料」をヘパリン二脱硫酸化酵素で消化した産物を再度、高速液体クロマトグラフィーで分画した際の、各画分における放射能分布を示す図である (B)。A はヘパリンに脱硫酸化酵素で処理していない対照を示す。縦軸は $^{35}\text{S}$ の放射能 ( $\text{dpm} \times 10^{-3}$ ) を示し、横軸は保持時間 (分) を示す。

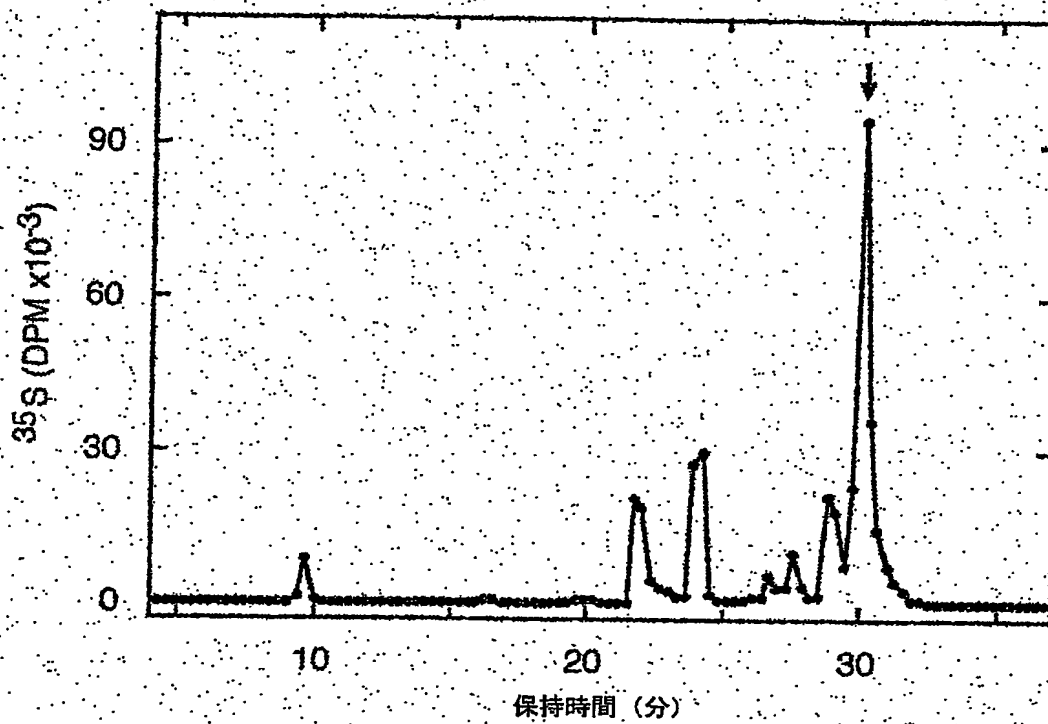
【図 3】 「濃縮試料」の不飽和ウロン酸のみを特異的に分解した試料を、高速液体クロマトグラフィーで分画した際の、各画分における放射能分布を示す図である (A)。B は放射能で標識した標準品を同様に高速液体黒尾的グラフィーで分画した際の、各画分における放射能分布を示す図である。縦軸は $^{35}\text{S}$ 又は $^3\text{H}$ の放射能 ( $\text{dpm} \times 10^{-3}$ ) を示し、横軸は保持時間 (分) を示す。

【図 4】 本発明酵素剤 1 で「放射能で標識した硫酸基」を転移したヘパラン硫酸を分解して得られる不飽和二糖を、高速液体クロマトグラフィーで分画した際の、各画分における放射能分布を示す図である。縦軸は $^{35}\text{S}$ の放射能 ( $\text{dpm} \times 10^{-3}$ ) を示し、横軸は保持時間 (分) を示す。

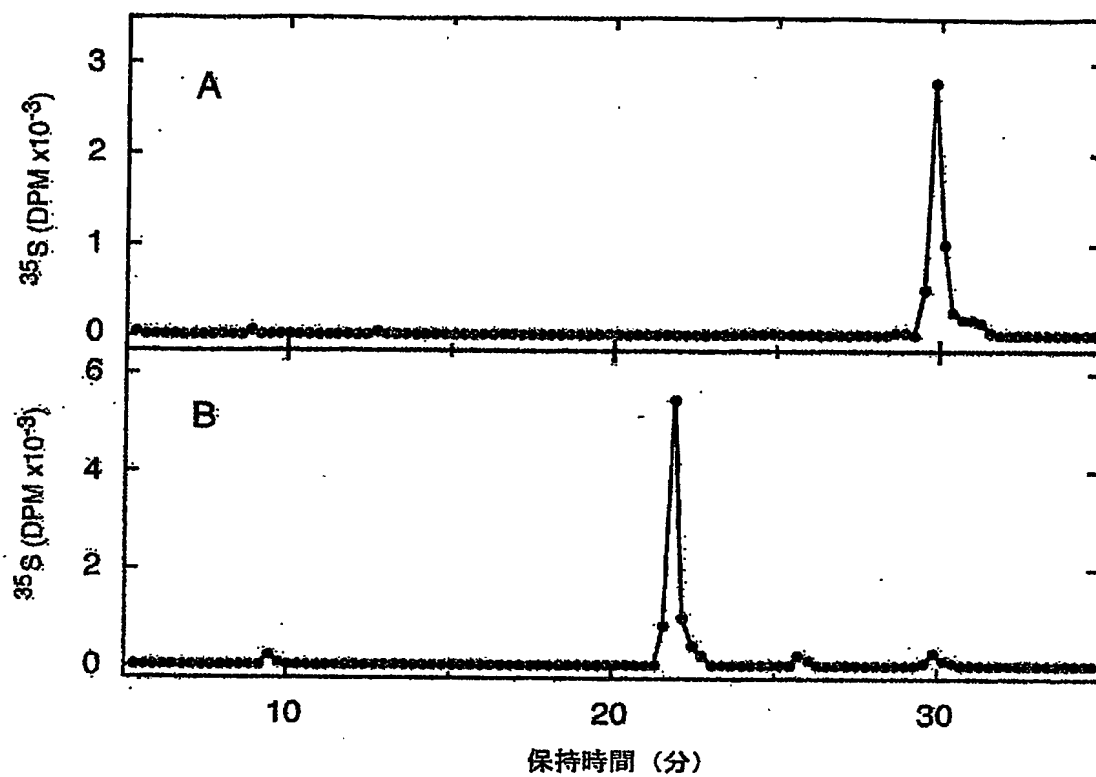
【書類名】

図面

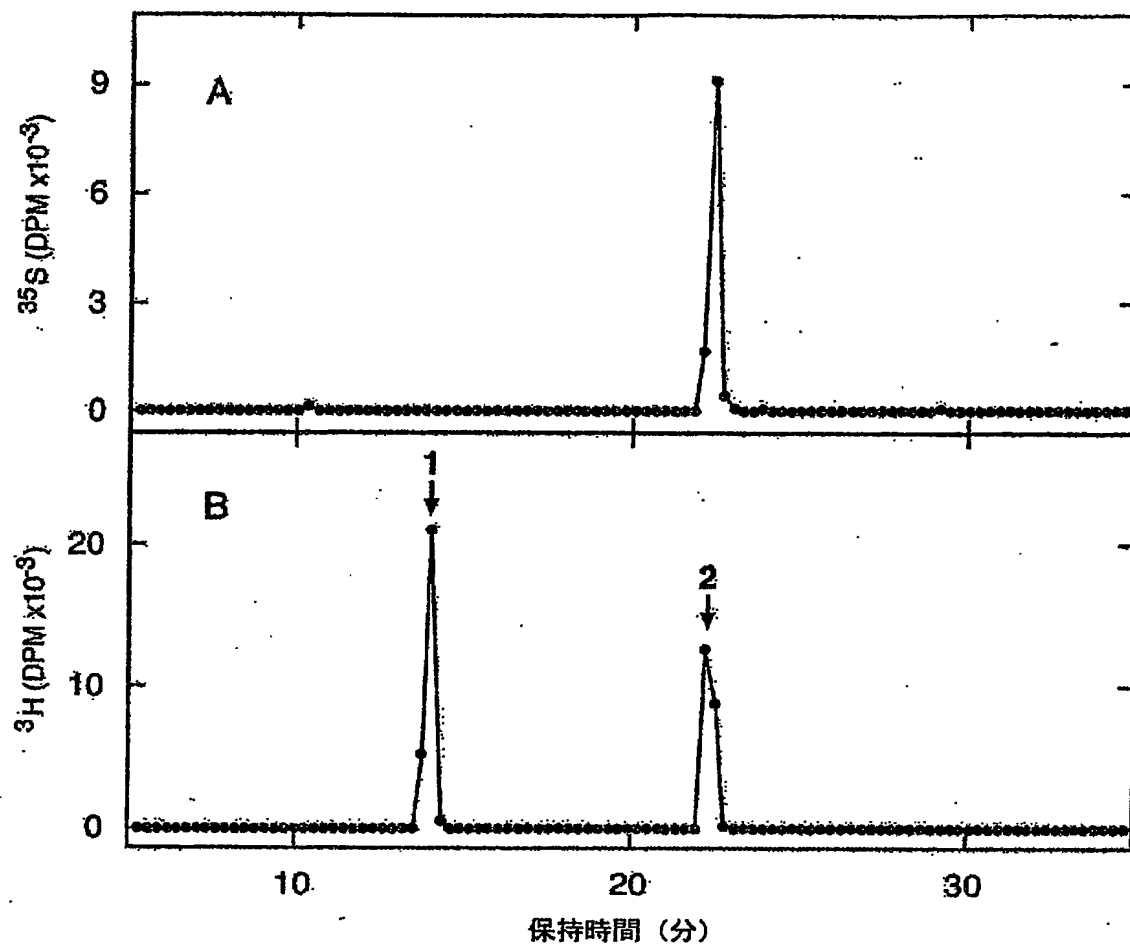
【図 1】



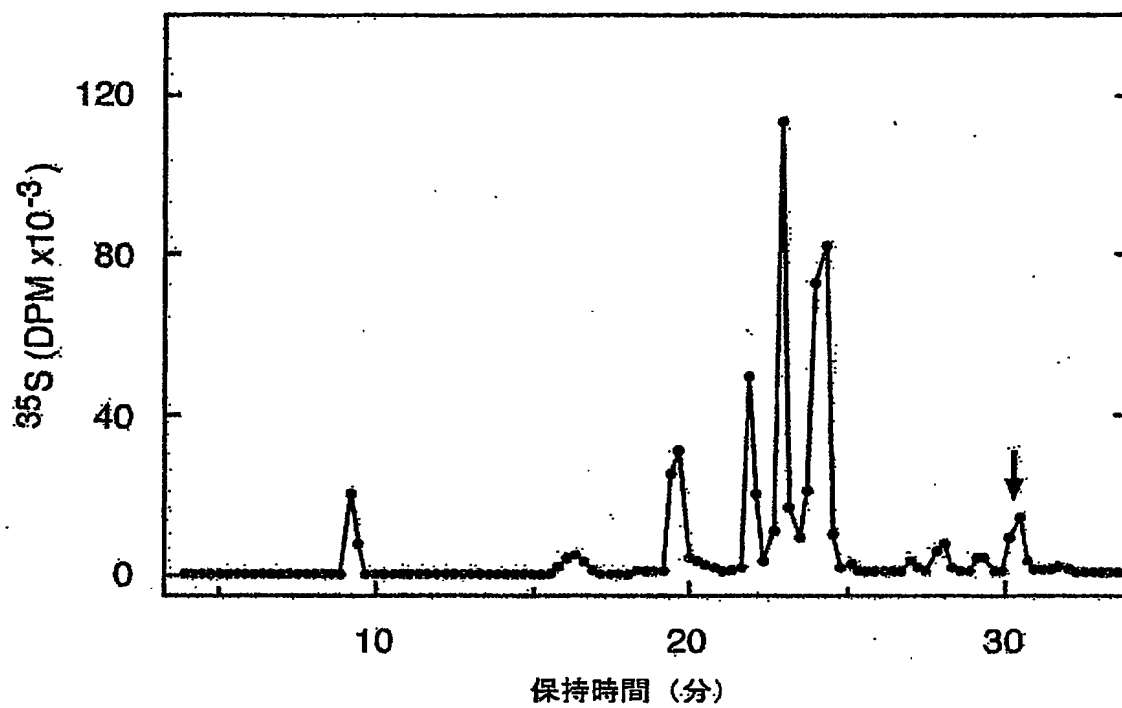
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

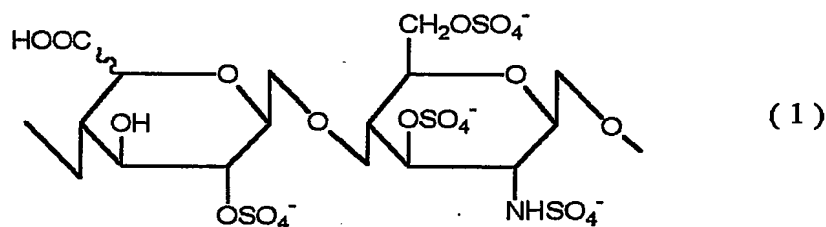
【課題】 四硫酸化構造を有するヘパリン／ヘパラン硫酸誘導体の合成のための酵素剤及び四硫酸化構造を有するヘパリン／ヘパラン硫酸誘導体の製造方法を提供する。

【解決手段】 下記（a）又は（b）記載のポリペプチドを含む、「下記式 1 記載の構造を含むグリコサミノグリカンの合成のための酵素剤」を用い、ヘパリン又はヘパラン硫酸へ硫酸基供与体から硫酸基を転移する。

（a）配列番号 2 記載のアミノ酸配列中のアミノ酸番号 3 7 乃至 3 4 6 からなるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

（b）配列番号 2 記載のアミノ酸配列中のアミノ酸番号 3 7 乃至 3 4 6 からなるアミノ酸配列に、1 又は複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入若しくは転移を有するアミノ酸配列を含むと共に、硫酸基受容体であるヘパリン又はヘパラン硫酸に対して、硫酸基供与体から硫酸基を転移する活性を有するポリペプチド。

【化 1】



【選択図】

なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-245994
受付番号	50201264505
書類名	特許願
担当官	田丸 三喜男 9079
作成日	平成14年 8月28日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 8月26日



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [301021533]

1. 変更年月日 2001年 4月 2日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都千代田区霞が関1-3-1  
氏 名 独立行政法人産業技術総合研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000195524]

1. 変更年月日 1990年 8月20日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

氏 名 生化学工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**